

Муниципальное бюджетное образовательное учреждение «Лицей № 22»

г. Иваново

# ***Определение азотобактеров в почвах разного происхождения***

***Хорецкая Надежда Сергеевна, Пырзу Антон Дмитриевич,***

*10 класс*

**Научный руководитель: *Волкова Татьяна Геннадьевна,***

доцент кафедры фундаментальной и прикладной химии,  
кандидат химических наук, доцент, ФГБОУ ВО «Ивановский  
государственный университет», г. Иваново

2021г.

## *Содержание*

Введение .....	3
I. Обзор литературы.....	4
II. Экспериментальная часть.....	5
II.1. Отбор почвенных образцов.....	5
II.2. Подготовка почвы для анализа.....	5
II.3. Определение механического состава почвы.....	5
II.4. Физико-химический анализ почвы.....	5
II.5. Выделение бактерий, фиксирующих атмосферный азот.....	6
II.6. Микроскопическое исследование.....	8
Заключение.....	9
Используемая литература.....	9
Приложение .....	10

## Введение

Один из процессов, определяющих биологическую продуктивность, - фиксация молекулярного азота. Круговорот азота в природе - ключевое звено биогеохимических циклов нашей планеты. Также следует заметить, что атмосфера Земли по объему почти на 80% состоит из этого химического элемента и является его основным источником. Азот входит в состав белков и других молекул, составляющих основу структурной организации всех уровней живого. Человек и животные способны усваивать азот в виде протеинов животного и растительного происхождения, а растения же - в виде нитратов и ионов аммония [1] (Приложение, рис.1).

Экономический и экологический кризис, снижение качества продукции растениеводства, падение естественного плодородия почв обуславливают всевозрастающее внимание к биологическому земледелию, суть которого заключается в использовании потенциальных возможностей естественных экосистем, в частности микроорганизмов азотфиксаторов.

**Цель исследования** – проведение поиска азотфиксирующих бактерий в почвах разного происхождения.

### **Задачи:**

- 1) отбор почвенных образцов и описание почвы по плану;
- 2) необходимый физико-химический анализ;
- 3) выделение бактерий, фиксирующих атмосферный азот;
- 4) проведение сравнительного анализа (проверка гипотезы).

### **Объекты исследования:**

- 1) перегной, полученный при перепревании навоза в течение 3-х лет;
- 2) компост, полученный из растительных остатков различного происхождения;
- 3) плодородный слой земли, после перекопки с сидератом (в нашем случае это была горчица).

**Гипотеза исследования:** исследуемые образцы почв равноценны по содержанию азотфиксирующих бактерий.

## I. Обзор литературы

Аэробные неспорообразующие грамотрицательные бактерии, фиксирующие молекулярный азот, были впервые выделены из почвы М.Бейеринком в 1901 году. Ученый дал им имя *Azotobacter chroococcum*. Уже само название говорит о том, что эти бактерии способны к концентрации азота, для них характерен коричневый пигмент – *chroo* и они создают кокковидные клетки – *coccum*. В 1903 году Лимпаном был охарактеризован еще один вид азотфиксирующих бактерий - *Azotobacter vinelandii* Lipman (Приложение, рис.2).

В 1904 году он охарактеризовал *Azotobacter beijerinckii* Lipman, название которого было дано в честь Мартина Бейеринка [2]. В середине XX века, в 1949 году, Н.А. Красильников охарактеризовал вид *Azotobacter nigricans*, Krasilnikov, который в 1981 году Томпсон и Скирман разделили на 2 подвида: *Azotobacter nigricans* subsp. *Nigricans* Krasilnikov, и *Azotobacter nigricans* subsp. *Achromogenes* Thompson and Skerman. Практически в это же время эти ученые охарактеризовали вид *Azotobacter armeniacus* Thompson and Skerman. Позднее, в 1991 году, Пейджем и Шивпрасадом были описаны особенности вида *Azotobacter salinestrus* Page and Shivprasad [1]. Сначала их относили к семейству *Azotobacteraceae* Pribram, но чуть позднее их определили к *Pseudomonadaceae* на основании изучения нуклеотидных последовательностей РНК. В 2004 году было проведено генетическое исследование и ученые выяснили, что *Azotobacter vinelandii* принадлежат к одному и тому же классу с бактерией *Pseudomonas aeruginosa*. В 2007 году ученые предположили близость родов *Azotobacter*, *Azomonas* и *Pseudomonas*. Род *Azotobacter* включал в себя такие виды как *Azotobacter agilis* (сейчас входит в состав рода *Azomonas*), *Azotobacter macrocytogenes* и *Azotobacter* [3].

Представители рода *Azotobacter* чаще всего обитают в нейтральных и слабощелочных почвах, а также в пресноводных водоемах и солончатых болотах. В литературе приводятся противоречивые данные о присутствии азотобактеров в почвах, богатых перегноем [4]. С одной стороны, различные перегнойные вещества не всегда могут усваиваться азотобактером. Следовательно, в почвах, которые богаты перегноем, азотобактеры не размножаются. С другой стороны, если в почве присутствуют органические соединения, а также продукты распада клеток растений и животных, азотобактер будет достаточно хорошо сформирован. А также он быстро размножается в почвах, которые были удобрены соломой и навозом.

Следует отметить, что Азотобактер очень чувствителен к кислотности почвы. Наиболее приемлемая для него сфера обитания - рН 7.2-8.2. В то же время он может быть на средах с рН от 4,5 до 9,0. Кислая окружающая среда отрицательно влияет на формирование колоний. Исследования показывают [5], что из кислых почв поступают неактивные формы азотобактерий – формы, потерявшие способность к фиксации молекулярного азота.

В почвах, отличающихся более высокой увлажненностью и многообразием луговой растительности, азотобактер можно увидеть только в

вегетационный период [6]. Азотобактер в торфяниках присутствует в небольших количествах. В достаточно увлажненных черноземах он развивается хорошо, и максимальное количество азотобактера образуется весной. В почвах России в основном имеется *Azotobacter Chroococcum*.

Азотфиксирующие бактерии имеют и уникальные свойства: кроме фиксации азота из воздуха они образуют большое количество биологически активных веществ – стимуляторов роста и витаминов, которые так необходимы для роста и развития растений [7].

Азотобактер используют и в экологическом мониторинге. Например, бактерии рода *Azotobacter* традиционно используются как индикаторы химического загрязнения почвы [8].

## **II. Экспериментальная часть**

Весь эксперимент выполнялся с применением профессионального набора (Приложение, рис.3) для поиска азотфиксирующих бактерий в соответствии с методическими рекомендациями.

### ***II.1. Отбор почвенных образцов***

Образцы почвы отбирались из поверхностных почвенных разрезов (Приложение, рис. 4-5). Максимальная глубина достигала 0,4 метра.

### ***II.2. Подготовка почвы для анализа***

Образцы почвы были высушены, также были убраны крупные остатки растительности, камни, мусор. Затем почвы были просеяны через сито с диаметром 1-2 мм.

### ***II.3. Определение механического состава почвы***

Определение механического состава почвы проводили по методике, представленной в методических рекомендациях «Охотник за микробами» [9].

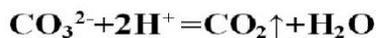
Образцы 1 и 2 соответствуют супесчаным почвам, образец 3 – среднесуглинистый (Приложение, рис.6).

### ***II.4. Физико-химический анализ почвы***

#### **Определение карбонатов в почве**

Эксперимент проводился на месте отбора проб (Приложение, рис.7). Раствор 0,1М HCl наносился на почвенный срез на разной глубине: 10 см, 20 см, 30 см и 40 см. Отрицательный результат - вспенивания не наблюдалось. В

исследуемых образцах количество карбонатов незначительно и реакция



не протекает.

### Определение кислотности среды почвенной вытяжки

Опыт по определению кислотности среды почвенной вытяжки показал, что во всех трех случаях мы получили рН, соответствующий слабокислой среде (рН=5) (Приложение, рис.8).

## **II.5. Выделение бактерий, фиксирующих атмосферный азот**

Для выявления азотобактера в почве и определения его относительного содержания пользуются методом почвенных комочков. Колонии азотобактеров растут на плотной питательной среде Эшби (рис.9), которая готовилась из вспомогательного раствора – это раствор солей хлорида натрия, сульфатов калия и магния, гидрофосфата калия и суспензии, включающей карбонат кальция, агар, глюкозу.

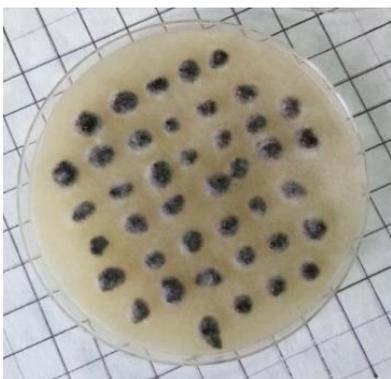


Рис.11. 4-суточные культуры

Из увлажненной почвы формировали комочки диаметром 3-4 мм и размещали их в чашке Петри (в узлах трафарета) (Приложение, рис.10). Чашки Петри с закрытыми крышками оставили при комнатной температуре на 4 дня. По истечении этого времени вокруг комочков появились обрастания (рис.11).

Наблюдение за ростом колоний проходило ежедневно, а сбор статистической информации на 4, 8 и 10 день согласно методике (см. Таблицу). Из представленных данных видно, что на 4 день колонии *Azotobacter agilis* (рис.12 слева) присутствуют на перегное и компосте, а в чашках Петри с плодородным слоем земли их нет. Это позволяет сделать вывод о том, что самыми активно растущими оказались штаммы азотобактеров перегноя. Так же нами были получены колонии *Azotobacter chroococcum* (рис.12 справа), которые образуют колонии с бурым, почти чёрным пигментом.

## Результаты статистической обработки

## День 4

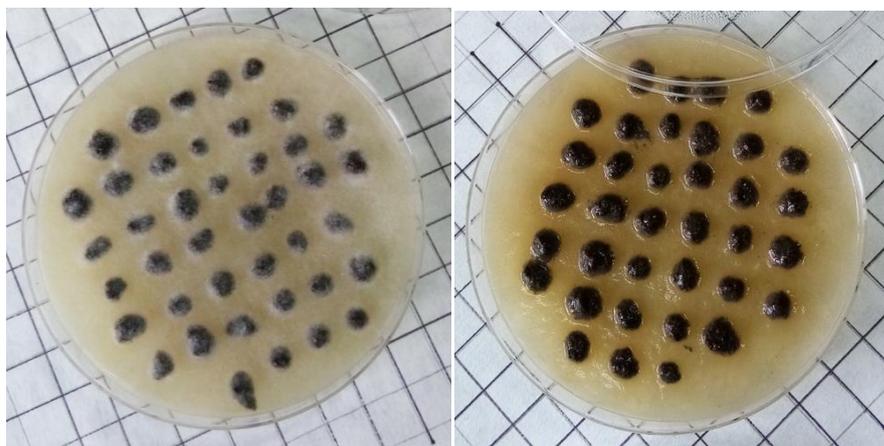
№ чашки	Всего комочков	С обрастанием		%	
		всего	Потемневшие	всего	Потемневшие
1.1	36	32	0	89	0
1.2	41	41	0	100	0
1.3	39	39	0	100	0
2.1	40	36	0	90	0
2.2	40	36	0	90	0
2.3	40	40	0	100	0
3.1	40	0	0	0	0
3.2	40	0	0	0	0
3.3	40	1	0	2,5	0

## День 8

№ чашки	Всего комочков	С обрастанием		%	
		всего	Потемневшие	всего	Потемневшие
1.1	36	34	34	94,4	94,4
1.2	41	41	38	100	92,6
1.3	39	39	37	100	94,8
2.1	40	40	36	100	90
2.2	40	39	36	97,5	90
2.3	40	40	40	100	100
3.1	40	35	0	87,5	0
3.2	40	13	0	32,5	0
3.3	40	20	0	50	0

## День 10

№ чашки	Всего комочков	С обрастанием		%	
		всего	Потемневшие	всего	Потемневшие
1.1	36	36	36	100	100
1.2	41	41	41	100	100
1.3	39	39	39	100	100
2.1	40	40	40	100	100
2.2	40	40	40	100	100
2.3	40	40	40	100	100
3.1	40	40	5	100	12,5
3.2	40	40	16	100	40
3.3	40	39	20	97,5	50



*Azotobacter agilis*

*Azotobacter chroococcum*

Рис.12. Культуры азотобактера

## II.6. Микроскопическое исследование

Для знакомства с азотобактером из блестящих слизистых колоний был приготовлен препарат-мазок, окрашенный фуксином Циля и тушью. Микроскопия показала, что азотобактерии присутствуют во всех анализируемых образцах почвы (рис.13.).

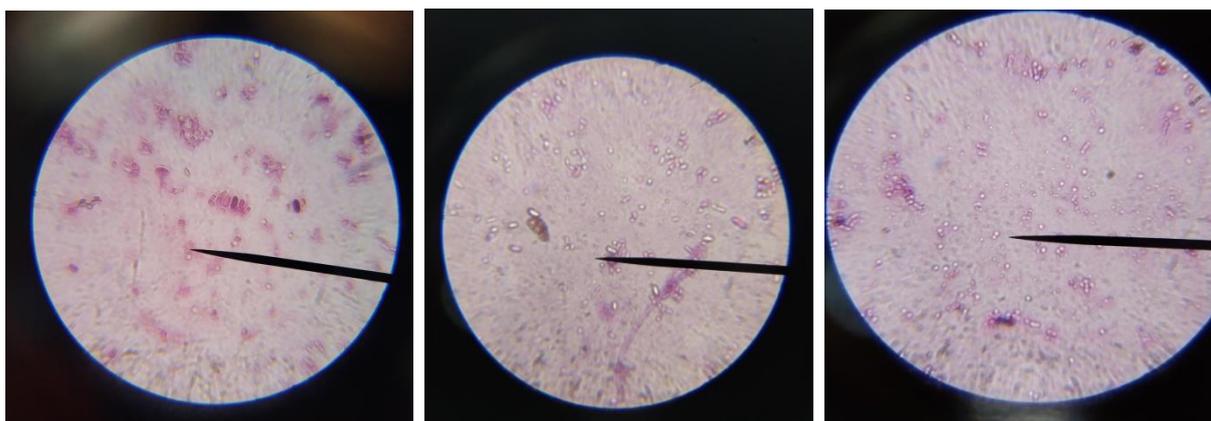


Рис.13. Снимки препаратов при x800 (водная иммерсия)

Клетки бактерий рода *Azotobacter* имеют овальную форму (окрашены в розовый цвет), располагаются одиночно, парами и неправильными скоплениями.

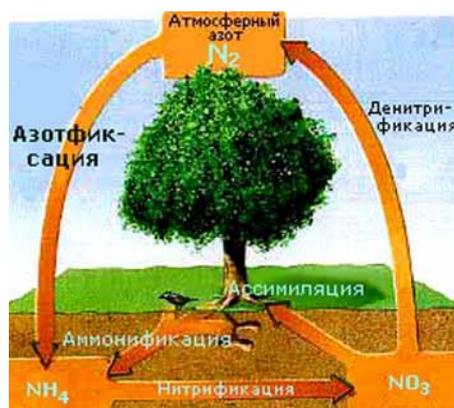
## Заключение

В ходе работы было выявлено, что азотобактерии присутствуют во всех анализируемых образцах почвы. Самыми активно растущими и многочисленными оказались штаммы азотобактеров перегноя. Компост также населен азотобактериями, которые значительно опережают рост штаммов плодородного слоя земли после перекопки с сидератом. Таким образом, внесение в почву перегноя и компоста будут способствовать обогащению ее азотфиксирующими бактериями.

## Используемая литература

1. Игнатов В.В. Биологическая фиксация азота и азотфиксаторы // Сорос. образоват. журн. — 1998. — № 9. — С. 28–33.
2. Мишустин, Е. Н. Клубеньковые бактерии и инокуляционный процесс. М.: Наука, 2013. – 240 с
3. Новикова Н. И. Современные представления о филогении и систематике клубеньковых бактерий // Микробиология. – 2016. – № 4. – С. 437 – 450.
4. Степанян Т. У. Использование клубеньковых бактерий в ассоциации с почвенными свободноживущими бактериями для инокуляции бобовых растений // Биолог.журн. Армении. – №3. – 2016. – С. 18 – 23.
5. Селивановская С. Ю. Микроорганизмы в круговороте биогенных элементов. Казань: Казан.ун–т, 2014. – 38 с. 26.
6. Пацко Е. В. Перспективность использования ассоциаций азотфиксирующих микроорганизмов для повышения урожайности растений // Бюл. Моск. общ.исп. прир. – 2014. – №. 2. – С. 84 – 86.
7. Пробиотики для растений: как накормить растущий мир. URL: <https://biomolecula.ru/articles/probiotiki-dlia-rastenii-kak-nakormit-rastushchii-mir>
8. Трифонова Т.А., О.Н. Сахно, О.Н. Забелина, И.Д. Феоктистова Сравнительная оценка состояния городских почв по их биологической активности // Вестн. Моск. Ун-та. сер. 17. Почвоведение. 2014. №3. С. 23-27.
9. Охотник за микробами. Методические рекомендации и инструкции по применению набора. Новосибирск, 2020.

## Приложение



- Азотфиксация:  
 $N_2 \rightarrow 2NH_3$
- Нитрификация  
 $NH_3 \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO_3^-$
- Денитрификация  
 $NO_3^- \rightarrow NO_2^- \rightarrow NO \rightarrow N_2O \rightarrow N_2$
- Ассимиляция  
 $NO_3^- \rightarrow NH_3 \rightarrow \text{органические вещества}$
- Аммонификация  
 $\text{органические вещества} \rightarrow NH_3$

Рис.1. Круговорот азота в природе

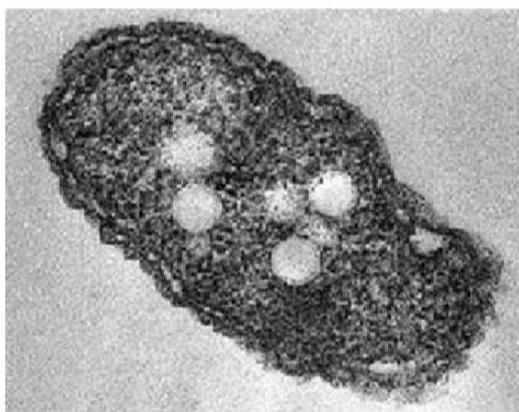
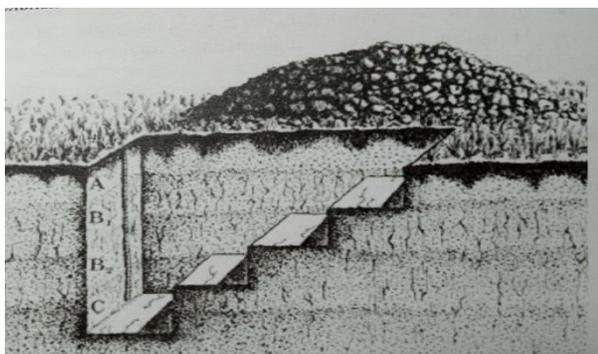


Рис. 2. *Azotobacter vinelandii*



Рис.3. Набор «Охотник за микробами»



*Рис.4. Почвенный разрез (схема)*



*Рис.5. Почвенные разрезы*



*Рис.6. Жгут из увлажненной почвы*



*Рис.7. Определение карбонатов на почвенных срезах*



*Рис. 8. Определение pH почвенных вытяжек*



*Рис.9. Приготовление среды Эшби*



*Рис. 10. Процедура посева*